

平成30年6月5日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15129

研究課題名(和文)神経活動による免疫ストーム防御の危機管理システムの解明

研究課題名(英文)Crisis management systems by neurons to defend against systemic immune storms

研究代表者

三澤 日出巳(MISAWA, HIDE MI)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：80219617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルファ7型ニコチン性ACh受容体($\alpha 7$ nAChR)の内在性修飾因子を同定する目的で、Ly6Hに着目した。 $\alpha 7$ nAChRのリガンド結合領域とグリシン受容体のイオンチャネル領域のキメラ受容体を構築し、Ly6Hの作用をパッチクランプ法により解析したところ、AChによる流入電流が抑制された。さらに、 $\alpha 7$ nAChRとNACHOおよびRic-3の3種のcDNAを共発現させ、機能的 $\alpha 7$ nAChRを形質膜上に安定発現する細胞株を作製した。この細胞でも、Ly6Hはリガンド誘発電流を抑制した。以上より、Ly6Hは、形質膜上において $\alpha 7$ nAChRに作用し、流入電流を抑制することが示された。

研究成果の概要(英文)：Alpha7-type nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) is a therapeutic target for various neurodegenerative and inflammatory conditions. To find a novel $\alpha 7$ nAChR modulator, we picked up Ly6H which is an endogenous protein with structural resemblance to a snake venom α -bungarotoxin. Chimeric receptor channel consisting of the ligand-binding domain of $\alpha 7$ nAChR and the channel domain of the glycine receptor was constructed. Electrophysiological analyses revealed that Ly6H reduced the magnitude of ACh-evoked currents. Next, we established stable cells expressing $\alpha 7$ nAChR, Ric-3 and NACHO, and ACh-induced currents were analyzed. The TARO cells (Triple Alpha7 Ric-3 NACHO cells) showed robust ligand-induced currents. Again, electrophysiological analyses revealed that expression of Ly6H in the TARO cells reduced the magnitude of $\alpha 7$ -mediated currents. These results indicate that Ly6H directly binds to the extracellular domain of $\alpha 7$ nAChR and negatively modulates its channel activity.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ニコチン受容体 アセチルコリン コリン作動性抗炎症反応 神経毒 内在性修飾因子 免疫ストーム

1. 研究開始当初の背景

過剰な自然免疫炎症反応（サイトカイン・ストーム）に対して、生体は自律神経系を活性化することで抗炎症反射を強力に駆動する。とりわけ迷走神経（ACh）を介する遠心性経路（コリン作動性抗炎症反応）は、動物実験で敗血症ショックの致死率を大幅に改善することから有力な創薬ターゲットと考えられているが、その詳細なメカニズムについては議論が分かれている。

炎症時における TNF- α 、IL-6 や HMGB1 などのサイトカインの過剰産生は、激しい炎症反応を引き起こす増悪ループを駆動し、サイトカイン・ストームと呼ばれる致死性の全身反応を引き起こす。このサイトカイン・ストームに対し、迷走神経の電気刺激は全身性ショックや臓器障害を強力に抑制するが、この作用は単球やマクロファージに発現するアルファ7型ニコチン性 ACh 受容体 ($\alpha 7$ nAChR) を介することが報告されている。 $\alpha 7$ nAChR は高い Ca^{2+} 透過性をもち、記憶・学習に関連する脳領域に発現することから、アルツハイマー病や統合失調症などの脳疾患の創薬ターゲットとして注目されているが、免疫・炎症性疾患のターゲットとしても重要視されている。

一方で、この $\alpha 7$ nAChR を刺激するリガンドの由来については謎のままである。迷走神経からの ACh がこの作用を担っている場合、単球やマクロファージの多くが神経終末に局在して ACh を受容することになる。ACh は、生体内の高い分解酵素活性（コリンエステラーゼ）のために半減期が数百ミリ秒と短く、放出部位の近傍で作用する必要がある。Tracey らは、迷走神経の活動は腹腔神経節を介して脾臓交感神経に伝達され、ノルアドレナリンが脾臓 T 細胞の β 受容体に作用することで T 細胞からの ACh を放出させ、その結果、単球やマクロファージ上の $\alpha 7$ nAChR が刺激されて抗炎症効果を発揮するとのモデルを提出している。

一方で、 $\alpha 7$ nAChR は生体内で重要な役割を担うにも関わらず、内在性修飾因子については殆ど報告がない。新規の内在性 $\alpha 7$ nAChR 修飾因子の同定は、本研究領域の発展に大きく寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

$\alpha 7$ nAChR の機能修飾タンパク質としては、ヘビ毒である α -ブングアロトキシンが知られている。 α -ブングアロトキシンは、4ないし5のジスルフィド結合により形成される three-finger structure (TFS) と呼ばれる特徴的な構造をもつ。これまでに、TFS が $\alpha 7$ nAChR との結合に必須であるとの報告がなされている。一方、哺乳動物の体内にも TFS 構造をもつタンパク質群として lymphocyte antigen-6 superfamily (Ly6SF) が存在する。Ly6SF に属するタンパク質は分子量が 10 kDa 程度と小さく、GPI アンカー型（膜結合型）または

シグナル配列をもつ分泌型として存在する。このうち数種は脳の nAChR 機能を修飾するとの報告がなされ、Lynx1、Lynx2、SLURP1 などが知られている。しかし、ヒトで発現している Ly6SF 約 30 種のうち、機能面における報告がなされているものは僅かであり、その役割は未だ解明されていない。

そこで、我々は新規の内在性 $\alpha 7$ nAChR 修飾因子の探索を目的とし、網羅的組織分布解析と in-situ hybridization 解析により絞り込みを行った。本研究では、 $\alpha 7$ nAChR の発現が強い海馬歯状回などで発現が見られる Ly6H に着目し、 $\alpha 7$ nAChR に対する修飾作用の解析を行った。

3. 研究の方法

$\alpha 7$ nAChR は、通常の培養細胞で cDNA 導入により機能的イオンチャネルを構築させることが困難であり、これが世界的にも研究進捗を遅らせる要因となっている。そこで、(1) $\alpha 7$ nAChR のリガンド結合領域とグリシン受容体のイオンチャネル領域を結合させたキメラ受容体チャネル ($\alpha 7$ -GlyR Chimera) 及び (2) 近年明らかとなったシャペロンタンパク質 NACHO と共発現させたネイティブ $\alpha 7$ nAChR 安定発現細胞 (TARO 細胞) を用いて、Ly6H の作用をパッチクランプ法、フローサイトメトリー法、ビオチン化アッセイ法などにより解析した。

4. 研究成果

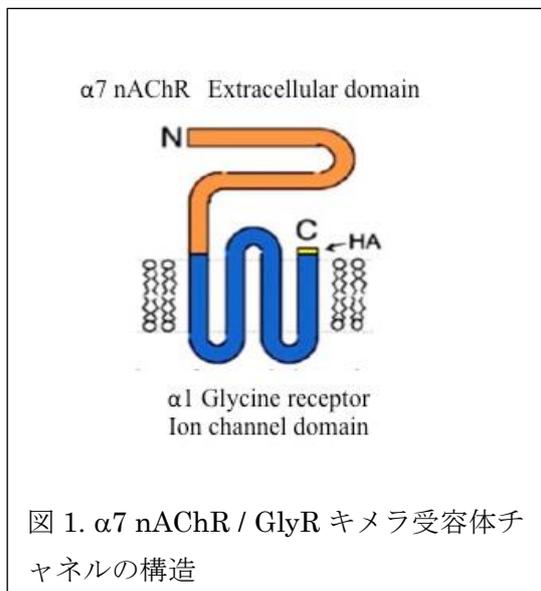
(1) Ly6H スーパーファミリーのマウスでの網羅的発現解析

これまでに、ヒトで発現している Ly6SF 約 30 種のうち、マウスでのホモログが確認できる分子種について、RT-PCR による各臓器レベルでの網羅的遺伝子発現解析と in-situ hybridization による mRNA の細胞レベルでの発現解析を行い、臓器レベル（脳での発現）と細胞レベル（海馬や大脳皮質）での絞り込みを行い、 $\alpha 7$ nAChR の機能修飾タンパク質の候補として Ly6H を見出した。

(2) キメラチャネルの作製と Ly6H の機能解析

$\alpha 7$ nAChR は、他の nAChR と比較して脱感作しやすく、応答電流の測定が難しい。そこで我々は、脱感作を受けず、アゴニスト繰り返し投与でも安定した応答電流測定が可能であると報告されている、 $\alpha 7$ nAChR の細胞外領域（リガンド結合領域）に $\alpha 1$ グリシン受容体の膜貫通・細胞内領域を結合させたキメラ受容体チャネル ($\alpha 7$ -GlyR Chimera) を作製し、ACh 応答電流を測定した（図 1）。まず、 $\alpha 7$ -GlyR Chimera を発現させた HEK293 細胞に ACh を投与したところ、応答電流が確認された。この反応は、 $\alpha 7$ nAChR の選択的アンタゴニストで

ある methyllycaconitine (MLA) を前投与しておくことで抑制された。次に、 $\alpha 7$ Chimera と Ly6H を共発現させた HEK293 細胞に ACh を投与したところ、流入電流の有意な抑制が観察された。



続いて、ビオチン化アッセイ法により $\alpha 7$ nAChR の膜上発現量を解析した。形質膜上に存在し細胞外に露出しているタンパク質のみが親水性ビオチン化試薬と反応し、これと Western Blotting 法を組み合わせることで形質膜上 $\alpha 7$ nAChR への影響を定量化した。その結果、 $\alpha 7$ nAChR の膜上発現量と細胞全体発現量の比は、Ly6H の共発現により影響を受けないことが判明した。

(3) ネイティブ $\alpha 7$ nAChR の安定発現細胞の樹立

2016 年に、小胞体に存在する新規タンパク質 NACHO が $\alpha 7$ nAChR の生合成、タンパク質折り畳みや細胞内輸送をシャペロンとして促進することで、機能的 $\alpha 7$ nAChR の形質膜上発現を大幅に増加させることが報告された。そこで、HEK293 細胞に $\alpha 7$ nAChR と NACHO および Ric-3 の 3 種の cDNA を発現させ、薬剤選択により機能的 $\alpha 7$ nAChR を形質膜上に発現する安定発現細胞株 (TARO 細胞: Triple Alpha7 Ric-3 NACHO 細胞) を作製した。TARO 細胞では $\alpha 7$ nAChR、Ric-3、NACHO が発現していることを Western blot 法により確認した後に、フローサイトメトリーを用いて $\alpha 7$ nAChR 形質膜上発現量を解析した。

Alexa-647 標識 α -ブングアロトキシンを用いて、形質膜上に結合する蛍光強度を解析したところ、TARO 細胞では全ての細胞で強い Alexa 647 蛍光が観察された。また、 $\alpha 7$ nAChR の細胞内領域に YFP を付した $\alpha 7$ nAChR-YFP と Ric-3 および NACHO を共発現させた TARO-YFP 細胞では形質膜で YFP 蛍光が検出された。このためこの細胞では、YFP の蛍光強度は $\alpha 7$ nAChR の形

質膜上発現の指標になると考えられた。パッチクランプ法によってリガンド応答電流を測定した。これらの細胞に choline を 30 秒間投与したところ、HEK293 細胞では応答電流が確認されなかったが、TARO 細胞および TARO-YFP 細胞では大きな応答電流が確認された。

(4) TARO 細胞での Ly6H の機能解析

TARO 細胞に Ly6H をトランスフェクションし、リガンド応答電流を測定した。なお、control では Ly6H の代わりにベクターのみをトランスフェクションした。Ly6H を発現させた TARO 細胞に choline を 30 秒間投与したところ、 $\alpha 7$ -GlyR Chimera と同様に、有意に応答電流が抑制されることが明らかとなった。

(5) まとめと考察

本研究に用いたキメラ受容体チャネル ($\alpha 7$ -GlyR Chimera) は、 $\alpha 7$ nAChR の細胞外領域に $\alpha 1$ glycine receptor の膜貫通・細胞内領域をつなげたものである。この $\alpha 7$ -GlyR Chimera で Ly6H の共発現による ACh 応答電流の抑制が確認されたことから、Ly6H は $\alpha 7$ nAChR の細胞外領域を作用点としていると考えられる。これに加え、ビオチン化アッセイ法により、Ly6H の共発現が $\alpha 7$ nAChR の形質膜上発現に影響を与えなかったことから、Ly6H の作用点は形質膜上であり、 $\alpha 7$ nAChR の細胞外領域に結合してチャネル活性を抑制すると考えられた。しかし、人工の融合タンパク質で得られた結果が、生体内の $\alpha 7$ nAChR 機能にどの程度まで外挿できるのか不明な点が残った。

そこで、新規の $\alpha 7$ nAChR のシャペロンタンパク質 NACHO および従来から知られている Ric-3 を共発現させることで、ネイティブ $\alpha 7$ nAChR の安定発現細胞の作製を試みた。本研究により、NACHO および Ric-3 を共発現させることで機能的な $\alpha 7$ nAChR を安定的に形質膜上に発現する細胞株 (TARO 細胞) の作製に成功し、 $\alpha 7$ nAChR の詳細な解析が初めて可能となった。TARO 細胞を用いた解析の結果、Ly6H の共発現により $\alpha 7$ nAChR の応答電流が抑制されることがネイティブな受容体でも確認され、Ly6H は形質膜上で直接に $\alpha 7$ nAChR に作用するとの強いエビデンスを得ることができた。

今後の研究課題としては、Ly6H と $\alpha 7$ nAChR との詳細な結合様式の解明が残されている。ACh 結合部位と同じであるのか、別のアロステリック部位に結合するか、などが解明すべき課題である。さらに生体内での作用を追求するためには、免疫組織化学による局在解析に使用できる高品質な Ly6H 抗体が求められるが、満足できる抗体は未だに得られていない。よい抗体が得られた場合には、個体の発生期や各種病態に

おける発現解析が可能となり、ヒト疾患にも外挿可能な知見が得られることが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K. and Kawashima, K. Expression and function of the cholinergic system in immune cells. *Front. Immunol.*, 8, 1085 (2017) doi: 10.3389/fimmu.2017.01085 (査読有)
2. Ishii, T., Kawakami, E., Endo, K., Misawa, H. and Watabe, K. Myelinating cocultures of rodent stem cell line-derived neurons and immortalized Schwann cells. *Neuropathology*, 37, 475-481 (2017) doi: 10.1111/neup.12397 (査読有)
3. Ishii, T., Kawakami, E., Endo, K., Misawa, H., and Watabe, K. Formation and spreading of TDP-43 aggregates in cultured neuronal and glial cells demonstrated by time-lapse imaging. *PLoS One*, 12, e0179375 (2017) doi: 10.1371/journal.pone.0179375 (査読有)
4. Fujii, T., Mashimo, M., Moriwaki, Y., Misawa, H., Ono, S., Horiguchi, K., and Kawashima, K. Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J. Pharmacol. Sci.*, 134, 1-21 (2017) doi: 10.1016/j.jphs.2017.05.002 (査読有)
5. Tsuji, S., Washimi, K., Kageyama, T., Yamashita, M., Yoshihara, M., Matsuura, R., Yokose, T., Kameda, Y., Hayashi, H., Morohoshi, T., Tsuura, Y., Yusa, T., Sato, T., Togayachi, A., Narimatsu, H., Nagasaki, T., Nakamoto, K., Moriwaki, Y., Misawa, H., Hiroshima, K., Miyagi, Y., and Imai, K. HEG1 is a novel mucin-like membrane protein that serves as a diagnostic and therapeutic target for malignant mesothelioma. *Sci. Rep.* 7, 45768 (2017) doi: 10.1038/srep45768 (査読有)
6. Anzai, I., Tokuda, E., Mukaiyama, A., Akiyama, S., Endo, F., Yamanaka, K., Misawa, H., and Furukawa, Y. A misfolded dimer of Cu/Zn-superoxide dismutase leading to pathological oligomerization in amyotrophic lateral sclerosis. *Protein Sci.*, 26, 484-496 (2017) doi: 10.1186/s13024-016-0145-9 (査読有)
7. Tokuda, E., Anzai, I., Nomura, T., Toichi, K., Watanabe, M., Ohara, S., Watanabe, S., Yamanaka, K., Morisaki, Y., Misawa, H., and Furukawa, Y. Immunochemical characterization on pathological oligomers of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Neurodegener.*, 12, 2 (2017) doi: 10.1186/s13024-016-0145-9 (査読有)
8. Yamanaka, T., Tosaki, A., Miyazaki, H., Kurosaka, M., Koike M., Uchiyama Y., Maity, S.N., Misawa, H., Takahashi, R., Shimogori, T., Hattori, N. and Nukina, N. Differential roles of NF-Y transcription factor in ER chaperone expression and neuronal maintenance in the CNS. *Sci. Rep.*, 6, 34575 (2016) doi: 10.1038/srep34575 (査読有)
9. Misawa, H., Inomata, D., Kikuchi, M., Maruyama, S., Moriwaki, Y., Okuda, T., Nukina, N. and Yamanaka, T. Reappraisal of VChT-Cre: Preference in slow motor neurons innervating type I or IIa muscle fibers. *genesis*, 54, 568-572 (2016) doi: 10.1002/dvg.22979 (査読有)
10. Morisaki, Y., Niikura, M., Watanabe, M., Onishi, K., Tanabe, S., Moriwaki, Y., Okuda, T., Ohara, S., Murayama, S., Takao, M., Uchida, S., Yamanaka, K. and Misawa, H. Selective expression of osteopontin in ALS-resistant motor neurons is a critical determinant of late phase neurodegeneration mediated by matrix metalloproteinase-9. *Sci. Rep.*, 6, 27354 (2016) doi: 10.1038/srep27354 (査読有)
11. Lasiene, J., Komine, O., Fujimori-Tonou, N., Powers, B., Endo, F., Watanabe, S., Shijie, J., Ravits, J., Horner, P., Misawa, H. and Yamanaka, K. Neuregulin 1 confers neuroprotection in SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis mice via restoration of C-boutons of spinal motor neurons. *Acta Neuropathol. Commun.*, 4, 15 (2016) doi: 10.1186/s40478-016-0286-7 (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. 浅野慎介, 森脇康博, 渡邊みずほ, 久保那月, 加藤総夫, 三澤日出巳. ニコチン性アセチルコリン受容体に対する内在性モジュレーターLy6Hの調節作用. 第138回日本薬理学会関東部会, 東京都, 2018/3/10
2. 古川良明, 徳田栄一, 大原慎司, 山中宏二, 三澤日出巳. 筋萎縮性側索硬化症にみられる変異型 SOD1 への金属イオン結合の異常. 2017 年度生命科学系学会合同年会 (ConBio2017), 神戸市, 2017/12/9
3. 渡邊みずほ, 森脇康博, 久保那月, 加藤総夫, 三澤日出巳. 内在性神経毒類似タンパク質 Ly6H によるニコチン受容体調節. 第137回日本薬理学会関東部会, 東京都, 2017/10/28
4. 三澤日出巳. ALS における運動ニューロン・サブタイプの選択的脆弱性の解析. シンポジウム「神経・精神疾患の創薬ターゲット: その共通性と特異性」 第 61 回日本薬理学会関東支部大会, 東京都, 2017/9/16

5. 三澤日出巳. 運動神経サブタイプと ALS における選択的脆弱性の解析. シンポジウム「中枢神経系の選択的細胞死：機序解明と治療法確立にむけて」第 90 回日本薬理学会年会 (2017/03/16) ()
- 研究者番号： ()
- (3) 連携研究者
6. 長崎俊憲, 森脇康博, 三澤日出巳, 辻祥太郎. 中皮腫マーカー蛋白質インテレクチン-1 と 1,2-diol の結合様式の解析. 第 90 回日本薬理学会年会 (2017/03/15) ()
- 研究者番号： ()
- (4) 研究協力者
7. 星野友則, 山下博史, 田代善崇, 三澤日出巳, 小峯起, 山中宏二, 漆谷真, 高橋良輔. ユビキチン・プロテアソーム機能障害による運動ニューロン神経変性機序. 第 39 回日本神経科学大会 (2016/07/20) ()
8. 石井智裕, 河上江美子, 遠藤堅太郎, 三澤日出巳, 渡部和彦. 培養ニューロンにおける TDP-43 凝集体形成の経時的観察. 第 134 回日本薬理学会関東部会 (2016/07/09)
9. 古川良明, 徳田栄一, 大原慎司, 三澤日出巳, 山中宏二. 免疫学的手法を利用した神経変性疾患関連タンパク質の構造変化解明. 第 43 回生体分子科学討論会 (2016/06/24)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三澤 日出巳 (MISAWA Hidemi)
 慶應義塾大学・薬学部・教授
 研究者番号：80219617

(2) 研究分担者